

BEST AVAILABLE COP.**Penicillin G acylase, a gene encoding the same and a method for the production of this enzyme**

Patent Number: ☐ [US5168048](#)
Publication date: 1992-12-01
Inventor(s): QUAX WILHELMUS J [NL]
Applicant(s): GIST BROCADES NV [NL]
Requested Patent: ☐ [JP4228073](#)
Application Number: US19910687400 19910418
Priority Number(s): EP19900200962 19900418; EP19900203463 19901220
IPC Classification: C07H21/04; C12N1/21; C12N15/09; C12P21/02
EC Classification: [C12N9/84](#)
Equivalents: DK453047T, ☐ [IE68078](#), ☐ [IE911294](#), KR152667, ☐ [PT97397](#)

Abstract

The invention provides a gene encoding penicillin G acylase, the enzyme encoded by said gene and a method for the production of said enzyme by incorporating said gene in a host and bringing the same to expression. The gene is preferably obtained from a strain of the microorganism *Alcaligenes faecalis*.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列リスト1に記載のヌクレオチド配列を実質的に有するペニシリンGアシラーゼをコードする遺伝子。

【請求項2】 *Alcaligenes faecalis* から単離された請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2記載のペニシリンGアシラーゼ遺伝子の転写調節配列。

【請求項4】 請求項1又は2記載のペニシリンGアシラーゼ遺伝子の翻訳調節配列。

【請求項5】 転写及び／又は翻訳調節配列を含むレギュロンの制御下にある請求項1又は2記載の遺伝子であって、該調節配列の一方又は両方がそれぞれ同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置き換えられている前記遺伝子。

【請求項6】 請求項1、2又は5記載のペニシリンGアシラーゼ遺伝子を1以上含むベクター。

【請求項7】 ペニシリンGアシラーゼ遺伝子の転写配列が *trp* プロモーターで置換されている請求項6記載のベクター。

【請求項8】 請求項6又は7記載のベクターを含む形質転換宿主。

【請求項9】 グラム陰性微生物である請求項8記載の形質転換宿主。

【請求項10】 微生物が *Alcaligenes* 属又は *Escherichia* 属のものである請求項9記載の形質転換宿主。

【請求項11】 微生物が *Alcaligenes faecalis* である請求項10記載の形質転換宿主。

【請求項12】 請求項8から11のいずれかに記載の形質転換宿主を培養し、単離形態のペニシリンGアシラーゼを回収することからなるペニシリンGアシラーゼの製造方法。

【請求項13】 請求項1から5のいずれかに記載の遺伝子によりコードされたアミノ酸配列から実質的になる単離された形態のペニシリンGアシラーゼ。

【請求項14】 固定化された形態の請求項13記載のペニシリンGアシラーゼ。

【請求項15】 (i) 請求項6又は7記載のDNAベクターを調製し、

(ii) 該ベクターで宿主を形質転換し、

(iii) 得られた形質転換体をクローン化し選択することからなる、宿主中でペニシリンGアシラーゼを産生又はその産生を増強する方法。

【請求項16】 グラム陰性の微生物を形質転換することを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】 *Alcaligenes* 属又は *Escherichia* 属の微生物を形質転換することを特徴とする請求項16記載の方法。

【請求項18】 *Alcaligenes faecalis*

is を形質転換することを特徴とする請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】 本発明は、ペニシリンGアシラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子によりコードされたペニシリンGアシラーゼ及び該酵素の製造方法に関する。

【先行技術】 ペニシリンGアシラーゼ（ペニシリンアミダーゼとも称されるベンジルペニシリンアミドヒドロラーゼ、EC 3. 5. 1. 11）は、ペニシリンG又は3-デスアセトキシセファロスポリンGを、半合成ペニシリン及びセファロスポリンの工業的生産の最も重要な中間体であるフェニル酢酸と6-アミノペニシラン酸（6-APA）又は7-アミノデスアセトキシセファロスポラン酸（7-ADCA）のそれぞれに加水分解するのに産業上使用されている酵素である。この酵素は、逆反応、即ち6-APA及び7-ADCAを有機エステルでN-アシル化してそれぞれ対応するN-アセチル化ペニシリン及び3-セフェム化合物を産生する反応も触媒する。Vandamme, E. J., *Microbial Enzymes and Bioconversion* 中の研究、E. H. Rose (Ed.), *Economic Microbiology* 5, 467-552 (1980); 及びP. B. Mahajan, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1, 83-86 (1982) を参照のこと。ペニシリンG及び3-デスアセトキシセファロスポリンGの脱アシル化に有用なペニシリンGアシラーゼ産生株として種々のタイプの微生物が文献に提案されている。これらのアシラーゼ産生株の例は、*Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila* 及び *Protus rettgeri* 種のいくつかの株である。*Alcaligenes faecalis* の全細胞フラクション中のペニシリンGアシラーゼ活性が報告されていることも挙げられる (C. A. Claveridge et al., *Nature* 4733, 237-238 (1960))。しかしながら、*Alcaligenes faecalis* からのこの活性を司る酵素は今まで報告されたことはない。組換えDNA法の使用は、産業上使用されるペニシリンGアシラーゼの生産レベルを上げることを可能にし (Mayer et al., *Adv. Biotechnol.* 1, 83-86 (1982))、これらの酵素のプロセッシングについての考察を拡大した (Schumacher et al., *Nucleic Acids Res.* 14, 5713-5727 (1986))。E. coli のペニシリンGアシラーゼは、巨大な前駆体タンパク質として産生され、この前駆体はさらに小さい (α) サブユニット及び大きい (β) サブユニットを構成するペリプラスミック成熟タンパク質にプロセッシングされることが判明した。*Kluyvera citrophila* ア

4

にリン酸バッファーで緩衝化された緩衝溶液中の酵母抽出物とすることができる。任意の *Alcaligenes faecalis* 株を使用することができる。酵素はそれ自体公知の方法で精製するが精製は好ましくは、第1に例えば、エステル化セルロースで行い、次に例えば特にヒドロキシアパタイトを使用したゲロクロマトグラフィーを使用する二段階で行うのが好ましい。精製酵素は、好ましくは各サブユニットのNH₂-末端の、ペプチドフラグメントのアミノ酸分析にかけることができる。決定されたアミノ酸配列から、該遺伝子配列検出のためのプローブを得ることができる。*A. faecalis* のペニシリン加水分解活性が精製ペニシリンGアシラーゼに存在することが初めて示され、該酵素は26 kD及び59 kDの大きさの2つのサブユニットのヘテロ2量体からなることが判明した。*A. faecalis* *pac* 遺伝子は、それ自体公知の方法でクロモソームDNAから同定することができる。該遺伝子は、実質的に図1に示した構造を有する。図1に示した配列とハイブリダイズすることができ、実質的に同じ構造の酵素をコードする全ての相同遺伝子は、本発明に包含されるものと理解される。ハイブリッド安定性についての種々の因子の影響の分析から得られた下記式、 $T_m = 81 + 16.6 (\log 10 C) + 0.4 (\% G + C) - 600 / n - 1.5 \%$ 不適合 (Ausubal et al., 前出) n = プローブの最短鎖長 C = イオン強度 (M) $G + C$ = 塩基組成は、DNA-DNAハイブリダイゼーション法を使用して相同性のどのレベルが検出できるかを決定するのに使用することができる。従って、『実質的にその構造』という用語は、コンサーバティブ突然変異を含む配列を包含し、そのような配列では同じアミノ酸をコードするが、上記式に従いDNA中35%まで、典型的には10%まで異なってもよい。新規な *A. faecalis* *pac* 酵素のアミノ酸配列と、明らかにされている *E. coli* ペニシリンGアシラーゼのアミノ酸配列 (Schumacher et al., 前出) との相同性の比較によれば、全体的な相同性は43%にすぎないことが判明した。さらに、*Kluyvera citrophila* *pac* 酵素の公知のアミノ酸配列 (Barbero et al., 前出) との相同性も44%にすぎなかった。*A. faecalis* *pac* 遺伝子は、*E. coli* 中それ自身のプロモーター及び/又は誘導可能 *tac* 又は *trp* プロモーターの指令下に発現させることができる (第4図及び第5図参照)。ペニシリンGアシラーゼ生産の結果は極めて良好であった。この *pac* 遺伝子を *tac* プロモーターと共に使用した場合、生産は当初 *A. faecalis* 株と同等であったが、後者の場合はインデューサーとしてフェニル酢酸カリウムが必要であった。*trp* プロモーターの制御下にある *A. faecalis* *pac* 遺伝子を有する *E. coli* 株は、何の誘導もなしに、上

10

20

30

40

40

40

40

40

40

5

記の株の5倍高いペニシリンGアシラーゼ産生を示す。これにより、両株における、高価なフェニル酢酸カリウムインデューサーを使用した誘導を避けることができる。相同DNAのみを有する生産株を得るために、A. faecalis自体への形質転換を行った。二つの異なる方法により、A. faecalisへのDNA形質転換を満足に行うことができた。先ず第1に、E. coliからA. faecalisへの広範囲宿主プラスミドの抱合体転移を行うことができた。第2に、RSF 1010レプリコンに基づくプラスミドによるA. faecalisのエレクトロポレーションをおこなうことができた(BIORAD-ジーンバルサー)。A. faecalis遺伝子のクローニングに際しては、種々の転写配列を使用することができる。第1に、A. faecalis pac遺伝子を、それ自体のプロモーターの制御下にあるA. faecalis中にクローン化できる。外部pac遺伝子を持たないA. faecalisと比較して、ペニシリンGアシラーゼの生産は非常に高くなり、フェニル酢酸カリウム誘導を殆ど必要としない。第2に、インデューサーとは別にE. coli trpプロモーターを使用すると、同様に高い量のペニシリンGアシラーゼが得られた。第3に、Pseudomonas aeruginosaファージpf3から得られた二つの発現エレメント、プロモーターpf3及びp78(Luiten, PhD thesis, Nijmegen (1988))を使用すると、ペニシリンGアシラーゼの産生は、それ自体の又はE. coli trpプロモーターの制御下にある外部pac遺伝子を有するA. faecalisで得られたものよりもいくらか低かったが、それでも外部pac遺伝子を有しないA. faecalis株と比較すると改善されており、フェニル酢酸カリウム誘導に対する依存はずっと低い。先行技術は、ペニシリンGアシラーゼを単離形態で製造するためにA. faecalisを使用することを開示していない。また、新規なA. faecalisのペニシリンGアシラーゼ酵素の、E. coliのそれに対する改良された性質、あるいは組換えDNA法を使用してA. faecalisからのペニシリンGアシラーゼの産生を増加させ容易にすることについてはいずれも今までの先行技術には提案されていない。特にグラム陰性微生物、好ましくはAlcaligenes又はEscherichia属の微生物、より好ましくはA. faecalis中にクローン下されたA. faecalis pac遺伝子を使用して産生されるペニシリンGアシラーゼは、極めて多量に産生される。さらに、該ペニシリンGアシラーゼの安定性及び特に比活性は、今まで公知のペニシリンアシラーゼのものよりもはるかに高い。A. faecalisの精製調製物も得られ、これは現在公知のペニシリンアシラーゼのいずれよりも高い、好ましい基質ペニシリンGに対する比活性を示す。

6

さらに、この精製調製物をA. faecalisペニシリンGアシラーゼのE. coliペニシリンアシラーゼと比較した温度安定性を測定するのに使用した。A. faecalisペニシリンGアシラーゼの安定性は、E. coliペニシリンGアシラーゼのそれよりも有意に優れており、工業的条件下で長期間使用することができる。本発明はさらに、工業的過程において好ましく使用される、固定化形態のペニシリンGアシラーゼを提供する。その上に酵素を固定するキャリアーは、典型的には、任意にキトサンで架橋されたゼラチン、酸化アルミニウム、酸化ケイ素、イオン交換樹脂、アクリレートビーズ等であり、例えばEupergit (商標)である。以下の実施例により、本発明をさらに説明する。

材料及び方法

アシラーゼ遺伝子のクローニング及び検出

全体的なクローニング方法は、Maniatis et al. (1982及び1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory) 又はAusubel et al. (1987, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc., New York) 又はB. Perbal (1988, A Practical Guide to Molecular Cloning, 第2版, John Wiley and Sons Inc., New York) に記載されているように行った。これらのハンドブックは、rDNA分子の構築及び増幅のプロトコル、遺伝子ライブラリーの作製方法及び部位特異的又はランダムなDNAミューテーション惹起のプロトコルについて詳細に記載している。DNA操作に使用した酵素は、市場の供給者から購入しその説明に従い使用した。プラスミド及びE. coliクローニング宿主は、The Phabagen Collection (Utrecht) のような公共のカルチュアコレクションから入手した。

培地

フェニルアセチル-L-ロイシン (fal) の選択培地は、(Garcia et al 同書) に記されているように調製した。最小プレートは以下の通りある：M63最小アガー、2g/lグルコース、1mg/lチアミン、10mg/l L-プロリン及び適当な抗生物質(50µg/mlクロラムフェニコール(cap)又は25µg/mlアンピシリン(amp))。アシル-L-ロイシンの存在下で唯一増殖したE. coli HB101 (Leu-) の形質転換体がアシラーゼ遺伝子を有しているものとした。

最小E* 培地：16g/l Difco アガー、芽胞因子(spore element) 0.2g/l MgSO₄ · 7H₂O, 10g/l KH₂PO₄,

7

3. 5g/l Na (NH₄) HPO₄

1. 6g/l クエン酸ナトリウム

4xLBC 培地

酵母エキス20g/l, バクトトリプトン40g/l, NaCl 10g/l, cas アミノ酸 (cas amonoacid) 4g/l, バシルドン0.25g/l, (消泡剤86-013, Basildon Chemical Corporation), pH7.0. AF (*Alcaligenes faecalis*) 培地酵母エキス15g/l, Na₂HPO₄ 2H₂O 4.5g/l, KH₂PO₄ 3.4g/l, pH7.0 (誘導の場合: フェニル酢酸カリウム (KPA) 1.0g/l)

2xTY 培地

16g/l バクトトリプトン, 10g/l 酵母エキス, 5g/l NaCl. フェニルアセチルロイシンはLGSS, Transfer-bureau Nijmegenから購入した。

*A. faecalis*株ATCC 19018 (NCTC 415としても寄託) を *A. faecalis* pac 遺伝子の供与株、及び組換プラスミドの宿主として使用した。

*E. coli*株JM101, WK6 及びHB101 (Phabagen, Utrecht) を組換プラスミドの宿主として使用した。実施例1

A. faecalis ペニシリンアシラーゼの精製及び特性化

*A. faecalis*株ATCC 19018をAF培地で増殖させた。細胞を遠心分離により回収し、下記のバッファー: Tris 0.1M pH8.0; EDTA 0.2mM; リゾチーム0.02mg/mlに再懸濁し、30℃で2時間インキュベートした。細胞断片は遠心分離により除去した。ペニシリンGアシラーゼ (pac) を2段階で精製した。最初のものは、カルボキシメチルセルロース (CM-52 Whatman) により得た。第2のものは、ヒドロキシアパタイトゲルクロマトグラフィー (Biogel HTP, Biorad) を通して混入タンパク質を除去することにより得た。得られた純粋な pac は、二つの異なるサブユニットからなることが示された。この小サブユニット (α) と大サブユニット (β) のNH₂-末端アミノ酸分析を行った。結果は以下の通りである。

サブユニットα (26 KDa) NH₂-Q-X-Q-X-V-E-M-X-T

サブユニットβ (59 KDa) NH₂-S-N-L-W-S-T-X-P-E-X-V

実施例2

A. faecalis ペニシリンアシラーゼ遺伝子のクローニング

A. faecalis (ATCC 19018) のクロ

8

モソームDNAを単離し、Sau3Aにより部分的に消化した。4kbから7kbの範囲のフラクションを精製しベクターpACY184中に結合し、これをBamHIで消化した。DNAを*E. coli* HB101中に形質転換し、fal-プレート上にプレート化した (方法の項参照)。二つの陽性クローンpAF1とpAF2が同定された。これらのクローンは、*Serratia marcescens* オーバーレイ法 (Meevo otisom, v. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 372-378 (1987)) による試験でも陽性であった。pAF1プラスミドの6.4kbインサートを図1に示した。該遺伝子の位置決定は、*A. faecalis* pac のβサブユニットのNH₂-末端配列について設計したオリゴヌレオチドを使用して行った。下記のオリゴヌレオチドをpAF1インサート上のハイブリダイゼーションプローブとして使用した: AGC AAC CTG TGG AGC A/C C/G C TGCC CG GAG TGC GT制限地図上のハイブリダイゼーションシグナルの位置から、*A. faecalis* pac 遺伝子の方向を決定した (図1)。

実施例3

A. faecalis ペニシリンアシラーゼの配列決定

前記6.4kb インサートの3.9kb Sau3A-NdeIサブクローンはpac活性を与え、3.1kb Sau3A-SphIフラグメントは非活性であることが示された (図1)。3.9kbインサートのDNA配列は、pTZ18R及びpTZ19R (Parmacia) 中の適当なフラグメントのデオキシ配列決定により行った。*A. faecalis* pac をコードするDNA配列及び得られるアミノ酸配列を配列リスト1に示した。得られたアミノ酸配列から、*A. faecalis* pac は単一の大ペプチド鎖としてコードされ、これがプロセッシングを受けて二つの異なるサブユニット、即ちα及びβとなると結論される。該前駆体の5'部位に、該酵素のペリプラズムへのトランスロケーションに関わる典型的なシグナル配列がみられる。

実施例4

*E. coli*におけるペニシリンアシラーゼの発現

プラスミドpAF1をSalIで消化し、4.8kbフラグメントを精製した。該フラグメントを、SalI直線化ベクターpMCT-Ndeに結合した。この後者のベクターは、プラスミドpMc5-8 (EP-A-0351029) から、tacプロモーターを含むフラグメント、続いてRBS 部位及びNdeIクローニング部位をインサートすることにより構築した (図2)。*E. coli* HB101中に形質転換した後、得られたプラスミドpMcTAF1A (図3) は、それ自体のプロモーター及び/又は誘導可能tacプロモーター (DeB

oer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 21 (1983)) の作用下に *pac* を発現する。*pac* の発現レベルをさらに改善するために、二つの強力な *E. coli* プロモーターを正確な融合 (fusion) によりアシラーゼ出発コドンにクローン化した。このために、プラスミド pMcTAF1A のオリゴヌクレオチド部位指向性突然変異誘発 (Stanssens et al., 1989) を使用して Nde I 部位を ATG 出発コドンに構築し、プラスミド pMcTAF1ANde を得た。このプラスミドを Nde I で消化して再度環化し、*tac* プロモーターをアシラーゼ遺伝子の前に正確に位置させた (プラスミド pMcAftac)。他のプロモーターを挿入するために、pMcTAF1Nde を EcoRI 及び N*

表1: *E. coli* 中の *pac* の発現

株	KPA	IAA	IPTG	PAC 単位*
<i>A. faecalis</i> ATCC 19018	-	-	-	0.1
<i>A. faecalis</i> ATCC 19018	+	-	-	1
pMcAftac	-	-	-	1
pMcAftac	-	-	+	17
pMcAftap	-	-	-	4
pMcAftap	-	+	-	5

*KPA を含む培地中の *A. faecalis* ATCC 19018 を 1.0 として標準化した相対単位

種々のプラスミドを含む *E. coli* HB101 を 4XLB 中で 24 時間培養させた。*A. faecalis* は、AF 培地中で 24 時間培養させた。

実施例 5

A. faecalis 中におけるペニシリンアシラーゼの発現

A. faecalis 中への遺伝情報の安定な転移を可能にするため、DNA トランスフォーメーション系及び安定なクローニングベクターを研究する必要がある。驚くべきことに、Friedman et al., Gene 18, 289-296 (1982) に記載された方法を下記の改変を加えて使用すると、プラスミド pKT248 (Bagdasarian et al., Gene 16, 237-247 (1981)) の *A. faecalis* への 3 世代交配 (triparental mating) が可能であることが判明した。ヘルパープラスミド pRK2013 (Figurski & Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1648 (1979)) を有する *E. coli* MC1061 を *E. coli* HB101 (pKT248) 及び *A. faecalis* 感受性株と 2xTY アガープレート上で混合し

*del で消化し、大フラグメントをアガロースゲル上で精製した。トリプトファンプロモーターフラグメントを、6 合成オリゴヌクレオチドを使用してこの pMcTAF1ANde の精製 EcoRI-Nde I フラグメントに挿入した。これらのプロモーターの DNA 配列は、配列リスト 2 及び 3 に、またこれらのプロモーターの構造を図 4 及び図 5 にそれぞれ示した。これらのプロモーター構築物を *E. coli* HB101 中に形質転換し、*pac* の発現について試験した。表 1 は、*A. faecalis* ATCC19018 の発現レベルと比較した結果を示している。イソプロピルチオβ-ガラクトシド (IPTG) による *tac* プロモーターの誘導及びインドールアクリル酸 (IAA) による *trp* プロモーターの誘導も試験した。

た。プレートを一晩インキュベートし、コンジュゲーションを生起させた。クエン酸塩、芽胞因子及び選択抗生物質量 (50 µg/ml) 及び cap (25 µg/ml) を含む最小 E* 培地からなる選択アガープレートに、前記コンジュゲーションプレートをレプリカした。30℃一晩のインキュベートを行う。栄養要求マーカーにより *E. coli* 株について逆選択する。次に *A. faecalis* コロニーを 300 µl/ml ストレプトマイシンを含む 2xTY プレート上に展開する。*A. faecalis* *pac* 遺伝子のサブクローニングをプラスミド pKT248 中の単一の Sall I 部位に行った。プラスミド pAF1 の Tth I I I-Hpa I フラグメントを単離し、クローニングにより充填した。直線化した pKT248 の Sall I 部位もプラント化し、*E. coli* HB101 中への形質転換及び *fal* プレート上での選択によりプラスミド pKTAFA (図 6) を得た。このプラスミドを単離した後、上述した三世代交配法により *A. faecalis* 中に移した。得られた株を *A. faeca*

11s 増殖培地と共に振盪フラスコ中で増殖させ、当初の株と比較した。表2から判るように、pKTAFaを有する株におけるpac産生は高度に改善されている。さらに、インデューサーKPAがなくても高い産生が得られることが判る。これにより工業用培養培地から高価なインデューサーKPAを除外することができる。pac遺伝子の前にある非均一プロモーターを試験するために、pMcAFtrp、pMcAFpf3及びpMcAFp78のそれぞれのEcoRI-SalIフラグ*

表2: *A. faecalis* 形質転換体中のpacの産生

株	KPA	IAA	PAC単位*
pKT24B	-	-	0.1
pKT24B	+	-	1
pKTAFa	-	-	18
pKTAFa	+	-	22
pJRDAFtrp	-	-	18
pJRDAFtrp	-	+	19
pJRDAFpf3	-	-	5
pJRDAFpf3	+	-	8
pJRDAFp78	-	-	3
pJRDAFp78	+	-	5

*KPAを含む培地中の*A. faecalis* ATCC 19018を1.0として標準化した相対単位
全てのプラスミドは、*A. faecalis* ATCC 19018への3世代交配により転移させた。
プロモーターp78及びpf3はファージpf3から選択した(Luiten, 前出)。これらのプロモーターのDNA配列は、配列リスト4及び5にそれぞれ示し、これらのプロモーターの構造は図7及び図8にそれぞれ示した。

実施例6

A. faecalis ペニシリンアシラーゼの安定性
以下の手順を使用して、*A. faecalis* ペニシリンアシラーゼ及び*E. coli* ペニシリンアシラーゼを温度安定性について試験した：100mMリン酸ナトリウム、pH7.5溶液中、酵素溶液を種々の温度で40

5分間インキュベートする。50mMペニシリンGを基質として35℃で残存活性を測定した。5分後に、100%、50%及び0%活性を示す温度を決定した。表2から、*A. faecalis* 酵素は、*E. coli* 酵素よりも有意に安定であることが判る。

	100%	50%	0%
<i>A. faecalis</i>	45 °C	58.0 °C	66 °C
<i>E. coli</i> 5K	40 °C	54.8 °C	60 °C

E. coli 5Kの酵素調製物は、Produktions Gesellschaft für Biotechnologie Braunschweig (Mayer et al., 前出) より入手した。

配列リスト1

配列No. 1

配列タイプ: スクレオチドと対応するタンパク質

配列長: 2451塩基対

鎖: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: ゲノミック

微生物: *Alcaligenes faecalis*

特徴: 1 から2481 bp ペプチド

性質: ペニシリンアシラーゼをコードする遺伝子

ATG CAG AAA GCG CTT GTT CGT ACC GGG CTT GTG GCG GCT GCT TTG ATC	48
Met Gln Lys Gly Leu Val Arg Thr Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu Ile	
1 5 10 15	
TTG GGT TGG GCG GGG CCA CCG ACC CAC GCG CAA GTC CAG TCG GTA CAC	96
Leu Gly Trp Ala Gly Ala Pro Thr His Ala Gln Val Gln Ser Val Glu	
20 25 30	
GTG ATG CCG CAC AGT TAT GCG GTG CCG CAC GTC TTT GCG CAC AGC CAC	144
Val Met Arg Asp Ser Tyr Gly Val Pro His Val Phe Ala Asp Ser His	
35 40 45	
TAT GCG TTG TAT TAC GGC TAT GGT TAT GCG GTC GCG CAA GAC GGT CTG	192
Tyr Gly Leu Tyr Tyr Gly Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Gln Asp Arg Leu	
50 55 60	
TTG CAG ATG GAC ATG GCG CGT CCG TCC TTT GTC GCG ACA ACC GCG GCG	240
Phe Gln Met Asp Met Ala Arg Arg Ser Phe Val Gly Thr Thr Ala Ala	
65 70 75 80	
GTC TTA GCG CCT GGT GAG CAA GAT GCG TAC GTC AAC TAC CAC ATG CAG	288
Val Leu Gly Pro Gly Glu Gln Asp Ala Tyr Val Lys Tyr Asp Met Gln	
85 90 95	
GTG CCG CAG AAC TTC ACC CCG GCT TCC ATA CAG CCG CAG ATC GCG GCG	336
Val Arg Gln Asn Phe Thr Pro Ala Ser Ile Gln Arg Gln Ile Ala Ala	
100 105 110	
TTG TCC AAG GAT GAG GCG GAT ATT TTT CGT GCG TAT GCG GAT GCG TAT	384
Leu Ser Lys Asp Glu Arg Asp Ile Phe Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Tyr	
115 120 125	
AAC GCG TAT CTG CAG CAG GTG CCG CGT CCG CCG CAG TTG CTG CCG AAA	432
Asn Ala Tyr Leu Glu Gln Val Arg Arg Arg Pro Glu Leu Leu Pro Lys	
130 135 140	

配列リスト1 (続き)

GAA TAT GTG GAT TTT GAT TTC CAG CCC GAG CCG CTG ACC GAC TTT GAT Glu Tyr Val Asp Phe Asp Phe Gln Pro Glu Pro Leu Thr Asp Phe Asp 145 150 155 160	480
GTC GTC ATG ATC TGG GTG GGC TCC ATG GCC AAT CGC TTC TCC GAC ACG Val Val Met Ile Trp Val Gly Ser Met Ala Asn Arg Phe Ser Asp Thr 165 170 175	528
AAT CTG GAA GTG ACG GCA CTG GCC ATG CGT CAG TCT CTG GAG AAA CAG Asn Leu Glu Val Thr Ala Leu Ala Met Arg Gln Ser Leu Glu Lys Gln 180 185 190	576
CAC GGC CCG GAA CGA GGC CGT GCC TTG TTT GAT GAG CTG CTG TGG ATC His Gly Pro Glu Arg Gly Arg Ala Leu Phe Asp Glu Leu Leu Trp Ile 195 200 205	624
AAT GAC ACA ACA GCT CCG ACT ACG GTT CCG GCC CCG GCT GCG GAG CAC Asn Asp Thr Thr Ala Pro Thr Thr Val Pro Ala Pro Ala Ala Glu His 210 215 220	672
AAG CCG CAG GCA CAA GCA GCG ACG CAG GAT CTG GCT CAT GTT TCC TCG Lys Pro Gln Ala Gln Ala Gly Thr Gln Asp Leu Ala His Val Ser Ser 225 230 235 240	720
CCA GTA CTG GCT ACC GAG CTA GAG CGC CAG GAC AAG CAC TCG GCG GGC Pro Val Leu Ala Thr Glu Leu Glu Arg Gln Asp Lys His Trp Gly Gly 245 250 255	768
CGT GGC CCG GAC TTC GCG CCC AAG GCT AGC AAC CTG TCG AGC ACT CCG Arg Gly Pro Asp Phe Ala Pro Lys Ala Ser Asn Leu Trp Ser Thr Arg 260 265 270	816
CCC GAG CGA GTG CAG GAG GGC TCG ACC GTA CTG ATC AAC GGC CCA CAG Pro Glu Arg Val Gln Glu Gly Ser Thr Val Leu Ile Asn Gly Pro Gln 275 280 285	864
TTT GGC TGG TAC AAC CCG GGC TAC ACC TAT GGC ATT GGC TTG CAT GGC Phe Gly Trp Tyr Asn Pro Ala Tyr Thr Tyr Gly Ile Gly Leu His Gly 290 295 300	912
GCC GGC TTC GAT GTG GTG GGT AAT ACG CCT TTT GCC TAT CCG ATC GTA Ala Gly Phe Asp Val Val Gly Asn Thr Pro Phe Ala Tyr Pro Ile Val 305 310 315 320	960
CTG TTT GGC ACC AAT ACC GAG ATT GGC TGG GGG GCG ACT GCT GCG CCG Leu Phe Gly Thr Asn Ser Glu Ile Ala Trp Gly Ala Thr Ala Gly Pro 325 330 335	1008
CAA GAT GTG GTG GAC ATA TAT CAG GAA AAA TTC AAC CCC TCG CGT GCC Gln Asp Val Val Asp Ile Tyr Gln Glu Lys Leu Asn Pro Ser Arg Ala 340 345 350	1056

配列リスト1 (続き)

GAT CAG TAC TGG TTC AAC AAT GGC TGG CGC ACC ATG GAG CAG CGC AAG Asp Gln Tyr Trp Phe Asn Asn Ala Trp Arg Thr Met Glu Gln Arg Lys 355 360 365	1104
GAA COT ATC CAG CTA CCC CCT CAC CCT CAT CCC CAA ATG ACC ATC TCG Glu Arg Ile Gln Val Arg Gly Gln Ala Asp Arg Glu Met Thr Ile Trp 370 375 380	1152
CGC ACC GTG CAC GGC CCT GCG ATG CAG TTT GAT TAC GAT CAG GGC GGC Arg Thr Val His Gly Pro Val Met Gln Phe Asp Tyr Asp Gln Gly Ala 385 390 395 400	1200
GGC TAC AGC AAG AAA CGC AGC TGG GAT GGC TAT GAG GTG CAG TCC TTG Ala Tyr Ser Lys Lys Arg Ser Trp Asp Gly Tyr Glu Val Gln Ser Leu 405 410 415	1248
CTA GGC TGG TTG AAC GTC GGC AAG GGC CGC AAC TGG ACC GAG TTT CTG Leu Ala Trp Leu Asn Val Ala Lys Ala Arg Asn Trp Thr Glu Phe Leu 420 425 430	1296
GAT CAA GGC ACC AAG ATG GGC ATT TCG ATC AAC TGG TAC TAC GGC GAC Asp Gln Ala Ser Lys Met Ile Ser Ile Asn Trp Tyr Tyr Ala Asp 435 440 445	1344
AAG CAC GGC AAT ATT GGT TAT GTC TCG CCG GGC TTC CTG CCC CAG CGT Lys His Gly Asn Ile Gly Tyr Val Ser Pro Ala Phe Leu Pro Gln Arg 450 455 460	1392
CCT GGC GAT CAG GAC ATC GGT GTC CCT GGC AAG GGC GAT GGC ACC ATC Pro Ala Asp Gln Asp Ile Arg Val Pro Ala Lys Gly Asp Gly Ser Met 465 470 475 480	1440
GAG TGG CTG GGC ATC AAG AGT TTC GAC GCG ATT CCC AAA GGC TAC AAT Glu Trp Leu Gly Ile Lys Ser Phe Asp Ala Ile Pro Lys Ala Tyr Asn 485 490 495	1488
CCA CCC CAG GGC TAT CTG GTC AAC TGG AAC AAC AAG CGT GCG CGC GAC Pro Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Trp Asn Asn Lys Pro Ala Pro Asp 500 505 510	1536
AAA ACC AAT ACC GAT ACT TAC TAT TGG ACC TAT GGC GAC CGC ATG AAT Lys Thr Asn Thr Asp Thr Tyr Tyr Trp Thr Tyr Gly Asp Arg Met Asn 515 520 525	1584
GAA CTG CTC AGT CAG TAC CAG CAC AAA CAC CTC TTC AGT GTG CAG GAG Glu Leu Val Ser Gln Tyr Gln Gln Lys Asp Leu Phe Ser Val Gln Glu 530 535 540	1632
ATC TGG GAG TTC AAT CAA AAA GGC TCC TAT ACC GAT GTG AAC TGG CGC Ile Trp Glu Phe Asn Gln Lys Ala Ser Tyr Ser Asp Val Asn Trp Arg 545 550 555 560	1680

配列リスト1 (続き)

TAC TTC GGC CCA CAT CTG GAA AAG CTG GCG CAA CAG CTG CCG GGC GAC Tyr Phe Arg Pro His Leu Glu Lys Leu Ala Gln Gln Leu Pro Ala Asp 563 570 575	1728
GAT AGC AGC AAG GCG GCG CTG ACG ATG TTG CTC GCG TGG GAT GGA ATG Asp Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Met Leu Leu Ala Trp Asp Gly Met 580 585 590	1776
GAA CAG GAT CAG GGA GCG CAA AAT GCG GGA CCG GCG CCG GTG CTC TTC Glu Gln Asp Gln Gly Gly Gln Asn Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu Phe 595 600 605	1824
AAG ACC TGG CTG GAA GAA ATG TAC AAG CAG CTC TTG ATG CCG GTG GTG Lys Thr Trp Leu Glu Glu Met Tyr Lys Gln Val Leu Met Pro Val Val 610 615 620	1872
CGT GAA TCG CAT GCG GCG ATG TAT AGC CAG ACT GGT TTT GCG ACG CAG Pro Glu Ser His Arg Ala Met Tyr Ser Gln Thr Gly Phe Ala Thr Gln 625 630 635 640	1920
CAA GGT CCG AAC CCG GGT TCC ATC AAC TTG AGC ATG GGC ACC AAG GTC Gln Gly Pro Asn Pro Gly Ser Ile Asn Leu Ser Met Gly Thr Lys Val 645 650 655	1968
TTG TTG CGT GCG TTG CTG CTG GAA GCG CAT CCG GAT CCG AAG CGT GTG Leu Leu Arg Ala Leu Val Leu Glu Ala His Pro Asp Pro Lys Arg Val 660 665 670	2016
AAT GTC TTT GGT GAG CGT TCG TCT CAG GAA ATC ATG CAC ACA GCT TTG Asn Val Phe Gly Glu Arg Ser Ser Gln Glu Ile Met His Thr Ala Leu 675 680 685	2064
CAA AAT GCG CAG GCG GCG TTG AGC CAG CAG CAG GCG GCT CAG ATG GCG Gln Asn Ala Gln Ala Arg Leu Ser Gln Glu Gln Gly Ala Gln Met Ala 690 695 700	2112
CGC TGG ACC ATG CCG ACC TCC CTC CAT CGT TTC AGC CAC AAG AAC TTC Arg Trp Thr Met Pro Thr Ser Val His Arg Phe Ser Asp Lys Asn Phe 705 710 715 720	2160
ACG GGA ACC CCG CAG ACC ATG CCG GAT ACC TTT GCG TTT ACC GCG Thr Gly Thr Pro Gln Thr Met Pro Gly Asn Thr Phe Ala Phe Thr Gly 725 730 735	2208
TAT CAG AAT CGA GCG ACG GAA AAT AAC CCG CTC CTC TTT CAT GCG AAG Tyr Gln Asn Arg Gly Thr Glu Asn Asn Arg Val Val Phe Asp Ala Lys 740 745 750	2256
GGC GTG GAG TTC TCG CAC GCG ATG CCG CCG GCG CAA ACC GGT TTC ACC Gly Val Glu Phe Cys Asp Ala Met Pro Pro Gly Gln Ser Gly Phe Thr 755 760 765	2304

配列リスト1 (続き)

GAC CCG AAT GGA GTG CCG AGC CCG CAT TAT GAG GAT CAG CTG AAG TTG Asp Arg Asn Gly Val Arg Ser Pro His Tyr Glu Asp Gln Leu Lys Leu 770 775 780	2352
TAC GAG AAC TTC GAG TCG AAG ACC ATG GAT GTG ACC CMT GCG GAC ATT Tyr Glu Asn Phe Glu Cys Lys Thr Met Asp Val Thr His Ala Asp Ile 785 790 795 800	2400
CGT CGT AAT GCG CAA AGC AGC ACG ATG CTG TTG ATT CAG CCT CAG CCT Arg Arg Asn Ala Gln Ser Ser Thr Met Leu Leu Ile Gln Pro Gln Pro 805 810 815	2448
TAA End	2451

21

22

配列リスト2

配列No.2

配列タイプ:ヌクレオチド合成フラグメント

配列長: 124塩基対

鎖: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: 合成

特徴: bp 35-40 = "-35" 領域

bp 57-62 = "-10" 領域

bp 110-114 = シャインダルガルノlac 遺伝子

性質: プロモーター活性(lacプロモーター)

```

GAATTCGAGC TCGAGCTTAC TCGCATCCG CCTGTGACA ATTAAATCATC GGCTCGTATA    60
ATGTGTGGAA TTCTGAGCGG ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGGATCCA AGGAAAAACA    120
TAATC                                     124

```

配列リスト3

配列No.3

配列タイプ:ヌクレオチド合成フラグメント

配列長: 151塩基対

鎖: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: ゲノミック

特徴: bp 84-89 = "-35"

bp 107-112 = "-10"

bp 134-139 = シャインダルガルノ

性質: プロモーター活性(lrpプロモーター)

```

GANTTCAAGG CGCACTCCCG TTCTGGATAA TGTITTTTTC GCGACATCA TAACGGTCT    60
GGCAATATT CTGAATGAG CTGTGACAA TTAAATCATCG AACTAGTTAA CTAGTAGCA    120
AGTTCACGTA AAAAGGAGGT ATCGACATAT G                                     151

```

配列リスト4

配列No.4

配列タイプ:ヌクレオチド合成フラグメント

配列長: 114塩基対

組: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: ゲノミック

特徴: bp 23-28 = "-35" 領域

bp 48-51 = "-10" 領域

bp 100-103 = シャインダルガルノ p78

性質: プロモーター活性(pf3プロモーター)

GAATTCGATC GCAAAAAAGT ACTTCGAGT TOCGAAACC CTGTCTAGAG TTCTAGGTGC 60
 ATCTGAATGG AGCTGGGTAC CAATCTGTIT GCTTCGATTC AGGTGCATCA TAATG 114

配列リスト5

配列No.5

配列タイプ:ヌクレオチド合成フラグメント

配列長: 105塩基対

組: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: ゲノミック

特徴: bp 23-28 = "-35"

bp 48-51 = "-10"

bp 92-95 = シャインダルガルノ lac 遺伝子

性質: プロモーター活性(pf3プロモーター)

GAATTCGATC GCAAAAAAGT ACTTCGAGT TOCGAAACC CTGTCTAGAG TTCTAGGTGC 60
 ATCTGAATGG AGCTGGGTAC CCGGGGATCC AAGGAAAAC ATATG 105

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、A. faecalis ペニシリンG
 アシラーゼ遺伝子領域の形態地図を示す。pAF1のイ
 ンサートが示されている。

【図2】図2は、プラスミドpMcTNdeの構造を示
 す。

【図3】図3は、プラスミドpMCTAF1Aの構造を

示す。

【図4】図4は、tacプロモーターの構造を示す。

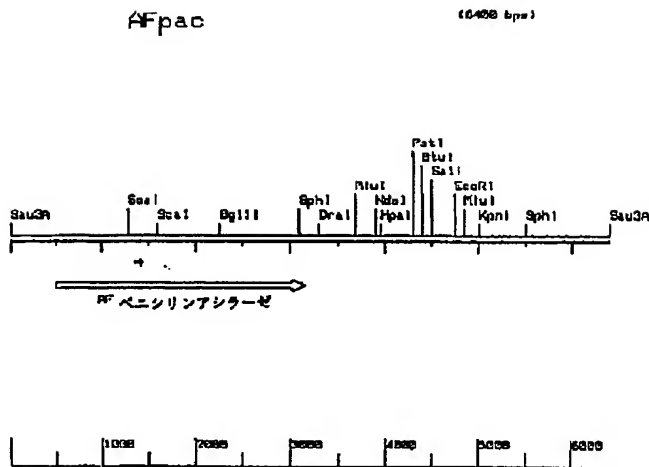
【図5】図5は、trpプロモーターの構造を示す。

【図6】図6は、プラスミドpKTAFAの構造を示
 す。

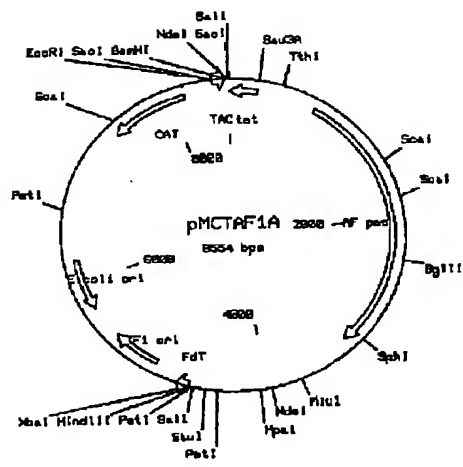
40 【図7】図7は、p78プロモーターの構造を示す。

【図8】図8は、pf3プロモーターの構造を示す。

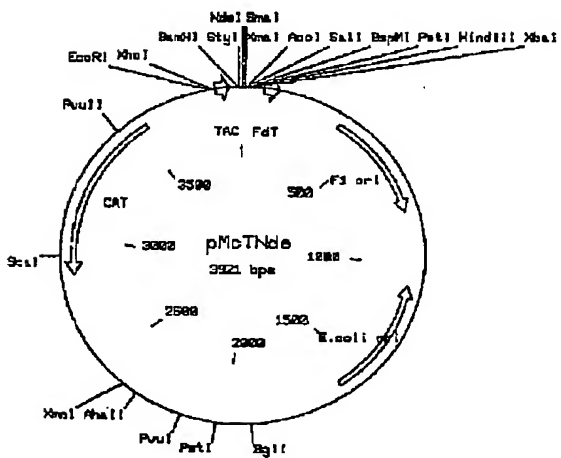
【図1】



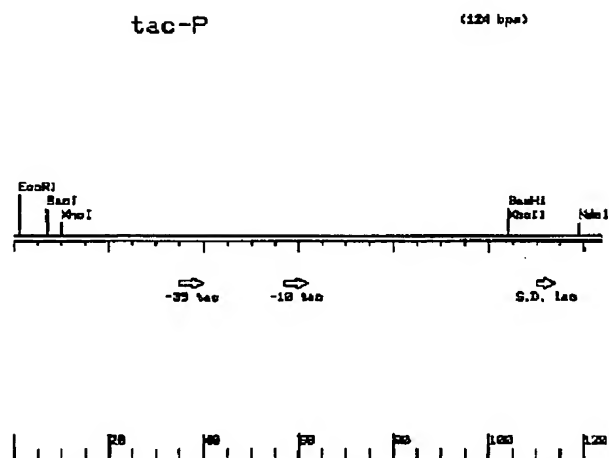
【図3】



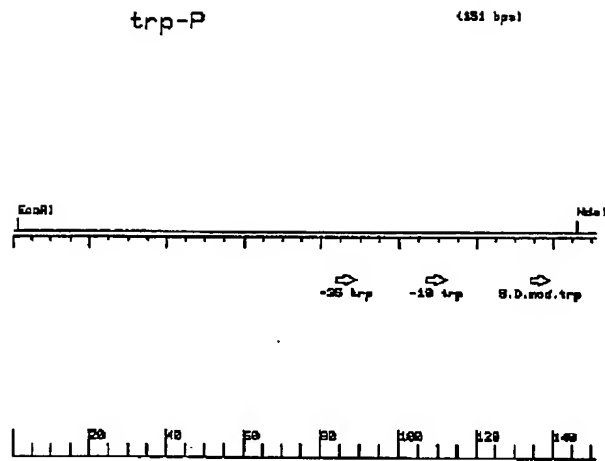
【図2】



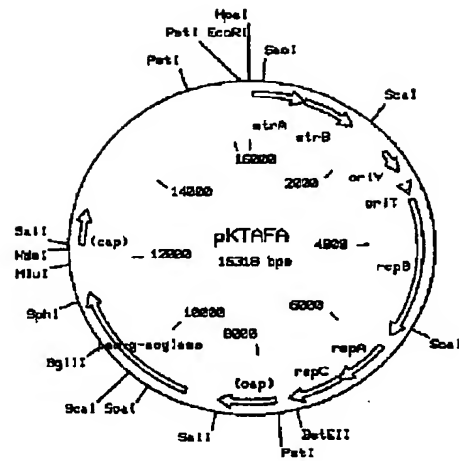
【図4】



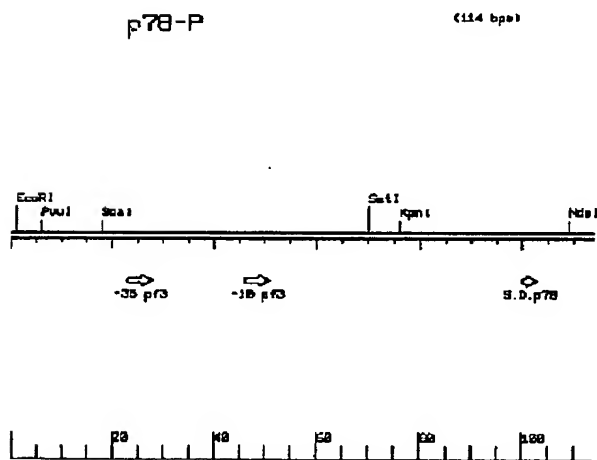
【図5】



【図6】



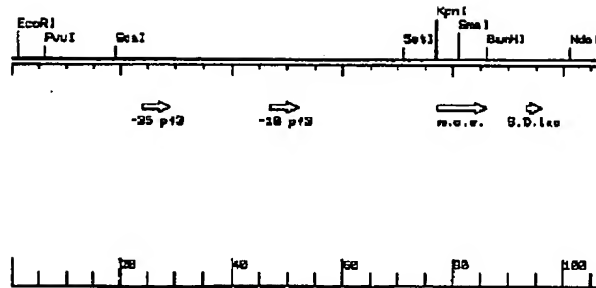
【図7】



【図8】

pf3-p

(186 bp)



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 9/84				
C 1 2 R 1:05)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:05)				
(C 1 2 N 15/55				
C 1 2 R 1:05)				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.